

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-197846

(43)Date of publication of application : 24.07.2001

(51)Int.Cl.

A01K 67/027
C12N 5/10
C12N 15/09

(21)Application number : 2000-009441

(71)Applicant : YS NEW TECHNOLOGY KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 18.01.2000

(72)Inventor : TAKAHASHI RIICHI
UEDA MASAJI

(54) METHOD FOR CREATING IMMUNOLOGICALLY TOLERANT ANIMAL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for creating an animal which is immunologically tolerant to a non-self protein, and further to provide the animal obtained thereby.

SOLUTION: This method comprises transducing a fused gene capable of producing a specific non-self protein by expressing the gene under the control of an expression-controlling region of a lactoprotein gene to a fertilized egg at the pronucleous stage, and creating the immunologically tolerant animal by using the resultant egg. The immunologically tolerant animal is obtained by using the method. The animal does not produce a neutralizing antibody against the non-self protein, and can be used for the evaluation of a pharmacological effect and toxicity of a medicine because the animal is immunologically tolerant to the non-self protein.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The production approach of an immunological tolerance animal for this specific protein which introduces into a pronucleus term fertilized egg the fusion gene which discovers the specific nonself protein for which it asks under control of milk protein gene expression regulatory region, and is characterized by using this.

[Claim 2] The production approach of an immunological tolerance animal according to claim 1 that milk protein gene expression regulatory region is cow alphaS1 casein gene expression regulatory region.

[Claim 3] The production approach of an immunological tolerance animal according to claim 1 or 2 that nonself protein is a human growth hormone.

[Claim 4] The production approach of an immunological tolerance animal according to claim 1 to 3 that an immunological tolerance animal is a rat.

[Claim 5] The immunological tolerance animal obtained by the approach according to claim 1 to 4.

[Claim 6] The immunological tolerance animal according to claim 5 whose animal is a rat.

[Claim 7] The approach of making an animal immunological tolerance to specific protein by which it is characterized by introducing into a pronucleus term fertilized egg the fusion gene which discovers the specific nonself protein for which it asks under control of milk protein gene expression regulatory region.

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the production approach of an animal and the immunological tolerance animal obtained by that cause which shows immunological tolerance to the specific nonself protein for which it asks. In order that the animal produced by this invention approach may show immunological tolerance to the specific nonself protein for which it asks, even if it prescribes this protein for the patient, the immune response of it is not carried out, and it does not produce the neutralizing antibody to this protein. Therefore, even if it repeats and prescribes a drug for the patient, it is very useful as an animal which can evaluate to accuracy the pharmacology effectiveness of the drug prescribed for the patient, and toxicity.

[0002]

[Description of the Prior Art] The drugs which consist of gene recombination mold Homo sapiens protein conventionally produced by the protein and biotechnology of the Homo sapiens origin aiming at adaptation in Homo sapiens. In the trial which scrutinizes the safety and effectiveness of (these being named generically and abbreviating to Homo sapiens protein drugs hereafter) Laboratory animals, such as a rat, are medicated with Homo sapiens protein drugs, the effectiveness and the side effect of drugs which were prescribed for the patient are caught to accuracy, and predicting the safety and effectiveness of drugs at the time of prescribing a medicine for the patient to Homo sapiens is called for. However, since Homo sapiens protein drugs are protein of a different kind for an animal, in many cases, these drugs show the quality of immunogenicity to an animal. Therefore, an animal produces a neutralizing antibody in response to sensitization with the drug (Homo sapiens protein drugs) prescribed for the patient. In the repeated-dose administration trial which medicates a long period of time especially repeatedly, production of a neutralizing antibody is accepted notably. For this reason, pharmacology-change and toxicology-change which take place by answering administration and an antibody being produced in case the repeated-dose administration trial which investigates the drug effect of such Homo sapiens protein drugs and toxicity is performed are predicted, and performing the trial which fully took into consideration relevance with the original pharmacology-change and toxicology-change based on the Homo sapiens protein drugs which are drugs is called for. That is, it is necessary to fully take into consideration the toxic new manifestation accompanying activation of complement etc. in the incidence rate and severity list of lowering of the drug effect by production of a neutralizing antibody or disappearance, change of the moving state of a drug, or a pharmacodynamics-property, and a side effect. Furthermore, it is necessary to pay attention also for formation and pathological change which is related calmly and may take place of an immune complex.

[0003] On the other hand, even when an antibody is detected, the pharmacological action of Homo sapiens protein drugs or toxicity prescribed for the patient is not neutralized by the immune response, and it may be necessary to stop these trials or to change the duration of test. However, since the degree of the neutralizing antibody which an animal produces in response to sensitization is various and it is difficult to expect the strength of the neutralization activity beforehand, the propriety of continuation of a repeated-dose administration trial cannot be judged easily. For this reason, it was anxious for production of the animal which shows the immunological tolerance by which a neutralizing antibody is not produced even if it carries out repeated-dose administration of the Homo sapiens protein drugs to a long period of time.

[0004] A small amount of antigen is repeated and prescribed for the patient at the specific stage after the approach of carrying out repeated-dose administration of the antigen, and causing immunological tolerance in a fetal period thru/or new term as the production approach of the animal which shows such immunological tolerance, the approach of prescribing for the patient with an immunosuppressant, and ablactation, and there is

inducement or a method of repeating and prescribing the antigen of a large quantity for the patient comparatively, and guiding a high zone paralysis about low zone tolerance. However, actuation of repeating and prescribing an antigen for the patient is dramatically complicated, and especially the repeated-dose administration of the antigen to an embryo or a newborn infant is technically difficult. Moreover, administration of an immunosuppressant has the fault to which the original immune system which an animal has is changed. Furthermore, in such acquired tolerance, it was difficult for the degree of the immunological tolerance guided to be various and to control by the individual to homogeneity.

[0005] Moreover, the transgenic animal technique in which technical establishment was made in recent years is utilized, and the method of making nonself protein recognize to be the quality of autologous protein, and making immunological tolerance gain by nature by introducing beforehand the gene of the Homo sapiens protein used as an antigen into an animal, and making it discovered in a body is devised. However, in order to guide immunological tolerance, an unnecessary operation of the Homo sapiens protein drugs produced continuously in the living body serves as original drug effect of these drugs, and hindrance of toxic exact assessment. On the other hand, although the activity of the fusion gene which utilized the gene expression control system which can perform guidance and control by drugs is devised, the effect of the drugs used for induction arises. A complicated activity is not needed from such a thing, but uniform immunological tolerance is shown, and development of the production technique of the animal which shows by nature the immunological tolerance which does not receive an unnecessary operation of the drug used for manifestation induction is desired.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] this invention persons inquired wholeheartedly about the production approach of the animal which shows immunological tolerance to the specific protein for which it asks in view of an above-mentioned situation. That is, how to produce the animal which utilizes a transgenic animal technique and shows immunological tolerance by nature was examined. In this case, I thought that the system which guides the introduced gene expression according to physiological conditions was effective. However, I thought it important for the degree by which an immunocompetent cell is educated how it would be effective to be what kind of organization when and to perform induction by physiological conditions, since changing with a stage and organizations is known. Homo sapiens and a goat -- the newborn infant immediately after birth -- a sex -- taking out the secrete called the witch's milk which was similar to colostrum from the mammary gland also in any is reported. Although this witch's milk is physiological and transient, it is considered to be based on the same hormone action as secretion of mother's milk, and is. Moreover, since the presentation was similar to colostrum, it was predicted that a milk protein gene is discovered on the occasion of secretion of the witch's milk. Then, the fusion gene discovered under rule of milk protein gene expression regulatory region was produced, and the transgenic rat which introduced this fusion gene was produced and scrutinized. Consequently, this transgenic rat found out discovering the fusion gene introduced into the infancy which secretes the witch's milk transient by the mammary gland (Hirabayashi M. et al., Mol.Reprod.Dev., 43, and 145-149 (1996)).

[0007] And I thought that making the gene of the protein for which it asks under rule of milk protein gene expression regulatory region discover since this introduced gene expression stage is in agreement at the educational stage to the self-protein of an immunocompetent cell had high possibility that the immunocompetent cell in connection with immunization, such as an antigen presenting cell, can be educated effectively.

[0008] And this gene expression does not produce this protein autogenously, unless these animals carry out lactation through the process of pregnancy and childbirth, since it is under rule of milk protein gene expression regulatory region. That is, in the usual repeated-dose administration trial using the female which does not include the male of these animals, or the process of pregnancy and childbirth, it was thought desirable not to receive an operation of the drug produced by this gene expression, and to present a trial with such an animal. Then, it came to complete this invention by introducing the fusion gene designed so that the gene of the protein for which it asks under rule of milk protein gene expression regulatory region might be discovered.

[0009] Therefore, the technical problem of this invention is to offer the production approach of an animal and the immunological tolerance animal obtained by that cause which shows immunological tolerance to the specific nonself protein for which it asks.

[0010]

[Means for Solving the Problem] This invention relates to the production approach of the animal which shows immunological tolerance to the specific nonself protein for which it asks. Moreover, it is related with the immunological tolerance animal obtained by this approach. That is, this invention is the approach of introducing into a pronucleus term fertilized egg the fusion gene which discovers the specific nonself protein for which it

asks under control of milk protein gene expression regulatory region, and producing the immunological tolerance animal to this protein using this. As milk protein gene expression regulatory region in this invention, cow alphaS1 casein gene expression regulatory region can be illustrated. Moreover, a human growth hormone can be mentioned as a gene of the specific nonself protein for which it asks. Moreover, this invention relates to the immunological tolerance animal obtained by such approach.

[0011] Furthermore, this invention relates to the approach of making an animal immunological tolerance to specific protein which consists of introducing the fusion gene which discovers the specific nonself protein for which it asks under control of milk protein gene expression regulatory region. In order that the animal produced by this invention approach may show immunological tolerance to the specific nonself protein for which it asks, even if it prescribes this protein for the patient, the immune response of it is not carried out, and it does not produce the neutralizing antibody to this protein. Therefore, even if it repeats and prescribes a drug for the patient, it is very useful as an animal which can evaluate to accuracy the pharmacology effectiveness of the drug prescribed for the patient, and toxicity.

[0012]

[Embodiment of the Invention] Since the immunological tolerance animal obtained by this invention is designed so that the introduced gene may be discovered under rule of milk protein gene expression regulatory region, by the trial which investigates the drug effect of the usual drugs, and toxicity, this gene does not discover it from the introduced gene expression being restricted to the female lactation period. Therefore, since it does not influence at all to the trial which should be carried out by not discovering this gene for such an animal, it is dramatically advantageous. Furthermore, it can carry out from being level with the very low manifestation by the mammary gland, or it having been effective, without using a special powerful expression vector, even when it is difficult cDNA to carry out a high manifestation when it generally introduces into an individual. Moreover, since immunological tolerance is materialized at least by the induction of this gene also in the case of a low manifestation, there is no fear of the being influenced and it is thought that it is advantageous.

[0013] As milk protein gene expression regulatory region used by this invention, it is [the various casein genes of mammals, such as Homo sapiens, a cow, a goat, a sheep, a rabbit, a rat, and a mouse, and] beta. - A lactoglobulin, alpha - Milk-serum-protein gene expression regulatory region, such as a lactalbumin and whey acidic protein (WAP), can be used. The fusion gene which introduced into the bottom of rule of this milk protein gene expression regulatory region the gene of the protein made into the object, i.e., protein to make into immunological tolerance, is produced. At this time, it is not especially limited about the gene of the protein made into the object that what is necessary is just to use the gene of protein to make into the immunological tolerance which is the object. Thus, the produced fusion gene is poured into a pronucleus term fertilized egg with conventional methods, such as a microinjection. About the fertilized egg which poured in the fusion gene, he is a recipient by the conventional method. (surrogate mother) It transplants and ubuko is obtained. Subsequently, it authorizes whether the target gene is introduced into the obtained ubuko. For example, the approach of authorizing by the PCR method using the suitable primer to the protein gene made into the object etc. is raised using some organizations. By breeding the animal individual by which installation of the object gene was checked, the immunological tolerance animal to the stable object protein can be established. The production approach of the animal which shows the immunological tolerance of this invention is widely applicable to mammalian at large, for example, a mouse, a rat, a guinea pig, a rabbit, a dog, an ape, etc.

[0014]

[Example] Although this invention is explained to a detail with the following examples, it is only only illustrating these and this invention is not limited at all by these.

[0015]

[Example 1] The production approach of the rat which discovers a human growth hormone gene under rule of milk protein gene expression regulatory region (1) So that a human growth hormone gene may be discovered under rule of the preparation approach cow alphaS1 casein gene expression regulatory region of an impregnation gene The designed fusion gene for impregnation (balphaS1 CN/hGH: drawing 1) was prepared according to the approach (T.Ninomiya et al., Mol.Reprod.Dev.37, and 276-283 (1994)) of Ninomiya and others. This impregnation gene is about 0.7 cow alphaS1 casein gene expression regulatory region kbs. About 2.1 human growth hormone gene kbs including a structural gene, the intron, and a poly A field It is constituted. Impregnation gene It refines using GENE CLEAN II (BIO 101 INC. company make), and an impregnation gene It prepared by the buffer for impregnation (10 mMTris-HCl containing 0.1mMEDTA, pH7.5) so that it might become 5microg/mL. In addition, the prepared impregnation gene solution was saved at -20 degrees C until it carried out impregnation actuation.

[0016] (2) The production approach above of a transgenic rat (1) The microinjection to the rat pronucleus term fertilized egg of the prepared DNA solution for impregnation was performed in the following way according to the conventional method. That is, the 8-weeks old Wistar (Wistar) rat which carried out sex-maturation was bred for light-and-darkness cycle 12 hours (it is ***** about 4:00-16:00) at the temperature of 23±2 degrees C, and 55±5% of humidity. Female sexual cycle was observed by the vagina smear, and the hormone processing date was chosen. First, the pregnant mare serum gonadotropin (the product made from Japanese ZENYAKU: all PMS medicine (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)) of 150 IU/kg is injected intraperitoneally to a female rat, superovulation is induced, and they are 75 IU/kg the 48 hours after. Homo sapiens chorionic gonadotropin (the Sankyo organ company make: PU ** low gene (human chorionic gonadotropin; hCG)) It crossed by living together with a male after administration. hCG The pronucleus term fertilized egg was extracted by oviduct perfusion 32 hours after administration. mKRB liquid (Toyoda Y. and Chang M.C., J.Reprod.Fertil., 36, and 9-22 (1974)) was used for culture of oviduct perfusion and an egg. Extracted fertilized egg After performing 37 degrees C and enzyme processing for 5 minutes in the mKRB liquid which contains hyaluronidase (sigma company make: Hyaluronidase TypeI-S) 0.1% and removing a cumulus cell, mKRB liquid washed 3 times, the enzyme was removed, and it saved to DNA impregnation actuation in the carbon-dioxide-gas incubator (5%CO₂-95% Air, 37 degree C, saturated humidity).

[0017] Thus, the DNA solution was poured into the male pronucleus of the prepared rat fertilized egg. Impregnation actuation was carried out. The 277-piece egg was transplanted to the recipient of 12 animals, and the offspring of 93 animals was obtained. The installation to the rat of poured-in DNA authorized DNA prepared from the tail which carried out docking, and which was obtained immediately after ablactation by the PCR method. namely, the primer set BAC003 (array table array number 1) -- and -- BAC102 (array table array number 2) was used. PCR reaction (by PerkinElmer, Inc. 480 mold DNA thermal SAIKURA is used) Enzyme reaction () [DNA 2 mug/mL,] [Taq] DNA polymerase 16 U/mL and primer ** 200 nM, 10 mM Tris-HCl buffer, 50mMKCl, 2.5mM MgCl₂, and 0.02% With gelatin and dNTP 0.2 mM 95 ** (for 0.5 minutes)-55 degree-C (for 1 minute)-72 degree C (for 1 minute) 30 cycles after, electrophoresis (Advance -- shrine MupidII -- using it -- 4% agarose gel, 40 mM Tris-acetate/1mM EDTA, and pH8)) was carried out. Ethidium-bromide dyeing detected the amplified DNA fragment. Consequently, the transgenic rat of eight animals was obtained. The transgenic rat which is three lines from which the amount of human growth hormones which it breeds with a conventional method, and an introductory gene is discovered, and produces the obtained rat in milk differs was established. In addition, the amount of human growth hormones in milk is a human growth hormone. ELISA kit (Boehringer Mannheim make; part number 1 585 878) It used and measured.

[0018] (3) The amount of human growth hormones produced in the milk of the transgenic lactation period of three lines produced by the property above (2) of a transgenic rat and the amount of human growth hormones in the blood serum at the time of the lactation period and the non-lactation period were measured. A result is shown in a table 1. Consequently, although line hGH-H is the high production line which produces the human growth hormone of about 3 mg/mL in milk and the amounts of human growth hormones in that blood serum are about 2400 ng/mL at the time of lactation They are 0.29 ng/mL in 0.75 ng/mL and a male for a female at the time of the non-lactation period. female of endogenous physiological concentrations 93 ng/mL and male 75 ng/mL (A. Ikeda et al., Endocrine J., 41, 523-529 (1994)), respectively -- 1/120 and 1/260 it was . From this transgenic rat showing neither growing gigantic nor the abnormalities in reproduction, the effect of the introduced gene was judged to be what is not. Line hGH-L was the low manifestation line which produces the human growth hormone of about 0.3 mg/mL in milk, and although the amounts of human growth hormones in the blood serum were about 700 ng/mL at the time of lactation, at the time of the non-lactation period, the sex was below limit of detection (50 pg/mL). On the other hand, line hGH-F was the fine manifestation line which produces the human growth hormone of about 0.01microg/mL in milk, and the amount of human growth hormones in the blood serum was below limit of detection altogether also in the male also in any at the time of non-lactation at the time of lactation. No line hGH-L and hGH-F showed growing gigantic and the abnormalities in reproduction, but the effect of the gene introduced also in these lines was judged to be what is not.

[0019]

[A table 1]

| ライン名 | 性 | ヒト成長ホルモン量 | | |
|-------|----|------------|------------------|-------------|
| | | 乳 (μg/mL) | 血清 (ng/ml) | |
| | | | 泌乳前 | 泌乳時 |
| hGH-H | 雌雄 | 3.400 — | 0.75 0.29 | 2.400 — |
| hGH-L | 雌雄 | 280 — | 測定限界以下 測定限界以下 | 700 — |
| hGH-P | 雌雄 | 0.01 — | 測定限界以下 測定限界以下 | 測定限界以下 — |

(*測定限界: 50 pg/mL 血清又は乳 (1 pg/mL))

[0020]

[Example 2] The transgenic rat obtained in the immunological tolerance trial example 1 was bred. In addition, the wet nurse of a wild nature kind was used in order to eliminate the effect of a taking-orally-immune response in childcare. The trial was presented with the male of each 8-weeks old line, and the male of the Wistar rat of wild species. The transgenic rat used 2-4 groups, and wild species used 5-8 groups. The human growth hormone of an antigen is gene recombination human growth hormone pharmaceutical preparation. (Humatrope; Eli Lilly Japan make) It was used. In addition, the average of eight animals the amount of human growth hormones in each rat blood serum in front of antigen sensitization by hGH-H (high manifestation line) It is limit of detection (50 pg/ml) except [all] having been 0.29 ng/ml (0.13 - 0.59 ng/ml). It was the following.

[0021] Administration to the rat of an antigen was performed in the following way. That is, they are 50microg / 250microl with PBS liquid. Equivalent Freund's perfect AJU band (DIFCO shrine make) was added to the prepared human growth hormone solution, and the emulsion was produced according to the conventional method. Obtained emulsion liquid 500microl It divided into several places and hypodermically [of a rat] was medicated. On the other hand by antigen the group non-prescribing a medicine for the patient, an emulsion is similarly produced with PBS liquid and equivalent Freund's perfect AJU band, and it is hypodermically. 500microl A medicine was prescribed for the patient every. The 2nd time and the 3rd administration were prescribed for the patient in the same way as the 1st time at intervals of one week using Freund's imperfection AJU band. The amount of the anti-human growth hormone antibody which extracted blood and was produced at the 4th week one week after the last immunity was measured in the following way. Coating liquid (50 mM Sodium carbonate pH9.6 which contains NaN3 0.02%) They are 96 holes about the human growth hormone solution prepared [ml] in 1microg /. In each hole of an ELISA plate (Nunc shrine make) 100microl It put at the room temperature for 2 hours, and the antigen was made to stick to a plate [every]. It is a penetrant remover about each [after removing an antigen solution] hole. (PBS which contains NaN3 20 and 0.02% of Tween(s) 0.5%) It washed 3 times.

[0022] Next, 200 mul After adding the blocking solution (block ace who diluted with PBS 4 times (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. make; catalog number UK-B25)) and putting at a room temperature for 2 hours, blocking liquid was removed, it washed 3 times by the penetrant remover, and the coat of the antigen was carried out. The ELISA plate was produced. Obtained ELISA To each hole of a plate, it is 10 times and 100 at PBS. Twice and 1,000 Blood sample diluted twice 100microl After putting at the room temperature for 2 hours and making an antigen-antibody reaction perform [every], the blood sample was removed and it washed 3 times by the penetrant remover. Next, anti-rat antibody (IgM+IgG) goat which was diluted with PBS 2000 times and which carried out the alkaline phosphatase indicator IgG solution (Cosmobio make; catalog number SBA 3010-04) 100microl It washed 5 times by the penetrant remover after the 2-hour reaction [every]. alkaline phosphatase substrate solution (it is substrate solution so that it may become 2 mg/mL about Sigma 104 phosphatase substrate (1M diethanolamine [containing 0.5 mM MgCl2 and 0.02% NaN3], pH9.8) dissolution) 100microl in addition, a reaction is carried out for 20 - 90 minutes at a room temperature -- making -- yellow coloring -- carrying out -- 50microl The reaction stop solution (3M NaOH) In addition, the reaction was suspended. Immuno reader (Bio-Rad Model3550-UV) It uses and is 405nm. The absorbance was measured. The absorbance estimated the amount of production of an antibody. A result is shown in a table 2.

[0023]

[A table 2]

| ライン名 | 感作 | 個体番号 | 抗原抗体反応（希釈倍数） | | |
|-----------------|--------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | (10 ¹) | (10 ²) | (10 ³) |
| 対照群 (Wistar) | 感作 (hGH) | 1 | +++ | +++ | ++ |
| | | 2 | +++ | +++ | ± |
| | | 3 | +++ | +++ | ++ |
| | | 4 | +++ | + | ± |
| | | 5 | +++ | +++ | + |
| | | 6 | +++ | +++ | + |
| | | 7 | +++ | +++ | ± |
| | | 8 | +++ | +++ | + |
| | 非感作 (PBS) | 6 | ± | - | - |
| | | 7 | - | - | - |
| hGH-H | 感作 (hGH) | 1 1 | - | - | - |
| | | 1 2 | - | - | - |
| | | 1 3 | - | - | - |
| | | 1 4 | - | - | - |
| | 非感作 (PBS) | 1 5 | - | - | - |
| | | 1 6 | - | - | - |
| | | 1 7 | ± | - | - |
| | | 1 8 | - | - | - |
| hGH-L | 感作 (hGH) | 1 9 | - | - | - |
| | | 2 0 | - | - | - |
| | 非感作 (PBS) | 2 1 | - | - | - |
| | | 2 2 | - | - | - |
| hGH-F | 感作 (hGH) | 2 3 | - | - | - |
| | | 2 4 | ± | - | - |
| | | 2 5 | - | - | - |
| | | 2 6 | - | - | - |
| | 非感作 (PBS) | 2 7 | - | - | - |
| | | 2 8 | - | - | - |
| | | 2 9 | - | - | - |
| | | 3 0 | - | - | - |

(* ELISA法による抗原抗体反応の判定は、各サンプル個体より得た血液の希釈検体の吸光度(E)を測定し、ブランク値(E₀)から測定値(E)がどの程度増加(E-E₀)したかを示した。そして、E-E₀>2E₀を+++、2E₀≥E-E₀>E₀を++、E₀≥E-E₀>0.5E₀を+、0.5E₀≥E-E₀>0.1E₀を±、0.1E₀≥E-E₀を-で表した。尚、E₀値は酵素標識抗体無添加時のブランク値の平均値 (OD値は(0.16)であった)を示す。)

[0024] consequently, by the sensitization group of the Wistar rat of a control group all the 10 time dilution and 100 Antigen-antibody reaction (+++) with eight pieces very strong at the blood sample of six individuals in the living body of twice dilution accepted. -- again 100 2 of one individual (No.3) of eight twice dilution which is the inside of the body, and eight individuals of 1000 time dilution individuals (No1 and No3) An antigen-antibody reaction strong at a blood sample (++), Moreover, 100 1 in 8 individuals individual of twice dilution (No4) 3 in 8 individuals individual of 1000 time dilution (No5, No6, No8) Antigen-antibody reaction clear at a blood sample (+) It accepted. Moreover, by the group for non-sensitization, an antigen-antibody reaction was not accepted in all examples by all dilution blood samples. On the other hand, in a transgenic rat, an antigen-antibody reaction was not able to be accepted in a sensitization group and a non-sensitization group in any. From this result, it checked that the immunological tolerance to a human growth hormone was materialized in all transgenic rats. And line where the human growth hormone produced in milk with this introduced gene is very low (hGH-F) It also sets and is a high production line (hGH-H). Low line (hGH-L) Since immunological tolerance was materialized similarly, it was checked that the production approach of the immunological tolerance animal offered by this invention is a dramatically excellent approach. Especially, it is a line. hGH-F was judged to be the most excellent line from not accepting a human growth hormone into a blood serum irrespective of the lactation and the non-lactation of a male and a female.

[0025]

[Effect of the Invention] The immunological tolerance animal obtained by the production approach of the animal which shows immunological tolerance by this invention to the specific nonself protein for which it asks, and this approach is offered. In order that the animal produced by this invention approach may show immunological tolerance to the specific nonself protein for which it asks, even if it prescribes this protein for the patient, the immune response of it is not carried out, and it does not produce the neutralizing antibody to this protein. Therefore, even if it repeats and prescribes a drug for the patient, it is very useful as an animal which can evaluate to accuracy the pharmacology effectiveness of the drug prescribed for the patient, and toxicity.

[0026]

[Layout Table]

SEQUENCE-LISTING<110> YS-NEW-TECHNOLOGY-INST. INC.<120> Animal with immunological-tolerance
<130> SNMFP00411<160> 2 <210> 1 <211> 25<212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> Description-
of-Artificial Sequence: Synthesized DNA <400> 1 agaacaatgc cattccattt cctgt 25 <210> 2 <211> 25<212> DNA
<213> Artificial Sequence <220> <223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA <400> 2 gtggtttcag
ttaaccaac caggt 25

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-197846

(P2001-197846A)

(43) 公開日 平成13年7月24日 (2001.7.24)

(51) Int.Cl.

識別記号

F I

テ-マ-ト (参考)

A 0 1 K 67/027

A 0 1 K 67/027

4 B 0 2 4

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/00

B 4 B 0 6 5

15/09

Z N A

15/00

Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2000-9441 (P2000-9441)

(22) 出願日 平成12年1月18日 (2000.1.18)

(71) 出願人 395007255

株式会社ワイエスニューテクノロジー研究
所

栃木県下都賀郡石橋町大字下石橋字花林
519番地

(72) 発明者 高橋 利一

栃木県下都賀郡石橋町大字下古山231 倉
井マンション3-D

(72) 発明者 上田 正次

埼玉県川越市今福1672-1-719

(74) 代理人 100090941

弁理士 藤野 清也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫寛容動物の作製方法

(57) 【要約】

【課題】 非自己蛋白質に対して免疫寛容である動物の
作製方法及びそれにより得られる動物。

【解決手段】 乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の制御下
で、特定の非自己蛋白質の遺伝子を発現する融合遺伝子
を前核期受精卵に導入し、これを用いて該蛋白質に対す
る免疫寛容動物を作製する方法、及びこの方法によって
得られた免疫寛容動物。該動物は非自己蛋白質に免疫寛
容であるので、この蛋白質に対して中和抗体を産生せ
ず、薬物の薬理効果や毒性の評価に用いることができ
る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の制御下で、所望する特定の非自己蛋白質を発現する融合遺伝子を前核期受精卵に導入し、これを用いることを特徴とする、該特定蛋白質に対する免疫寛容動物の作製方法。

【請求項2】 乳蛋白質遺伝子の発現制御領域が、ウシ α S1カゼイン遺伝子の発現制御領域である、請求項1記載の免疫寛容動物の作製方法。

【請求項3】 非自己蛋白質がヒト成長ホルモンである、請求項1又は2記載の免疫寛容動物の作製方法。

【請求項4】 免疫寛容動物がラットである請求項1～3のいずれかに記載の免疫寛容動物の作製方法。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載の方法により得られた免疫寛容動物。

【請求項6】 動物がラットである、請求項5記載の免疫寛容動物。

【請求項7】 乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の制御下で、所望する特定の非自己蛋白質を発現する融合遺伝子を前核期受精卵に導入することを特徴とする、動物を特定蛋白質に対して免疫寛容にする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示す動物の作製方法及びそれにより得られた免疫寛容動物に関する。本発明方法により作製される動物は、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示すため、該蛋白質を投与しても免疫応答せず、該蛋白質に対する中和抗体を産生しない。よって、薬物を反復して投与しても、投与した薬物の薬理効果や毒性を正確に評価することができる動物として、極めて有用である。

【0002】

【従来技術】従来、ヒトへの適応を目的とするヒト由来の蛋白質やバイオ技術により生産された遺伝子組換え型ヒト蛋白質からなる医薬品（以下、これらを総称してヒト蛋白質医薬品と略す）の安全性や有効性を精査する試験においては、ヒト蛋白質医薬品をラット等の実験動物に投与し、投与した医薬品の効果や副作用を正確にとらえ、ヒトに対して投与した場合の医薬品の安全性や有効性を予測することが求められている。しかし、ヒト蛋白質医薬品は、動物にとっては異種の蛋白質であるため、多くの場合、これらの医薬品は動物に対して免疫原性を示す。従って、動物は投与された薬物（ヒト蛋白質医薬品）で感作を受けて中和抗体を生産する。特に、長期に繰返して投与を行う反復投与試験においては、中和抗体の産生が顕著に認められる。このため、このようなヒト蛋白質医薬品の薬効や毒性を調べる反復投与試験を行う際には、投与に反応して抗体が生産されることで起こる薬理学的変化や毒性学的変化を予測し、薬物であるヒト蛋白質医薬品に基づく本来の薬理学的変化や毒性

学的変化との関連性を十分に考慮した試験を行うことが求められている。即ち、中和抗体の産生による薬効の低下又は消失、薬物の動態や薬動力学的特性の変化、副作用の発生率や重症度並びに補体の活性化に伴う新しい毒性の発現等を十分に考慮する必要がある。さらに、免疫複合体の形成や沈着に関連して起こりうる病理学的変化についても注意を払う必要がある。

【0003】一方、抗体が検出された場合でも、投与されたヒト蛋白質医薬品の薬理作用或いは毒性が免疫応答によって中和されず、これらの試験を中止したり、試験期間を変更する必要がある場合もある。しかし、感作を受けて動物が生産する中和抗体の度合は様々で、その中和活性の強さを前もって予想することが難しいため、反復投与試験の続行の可否は容易に判断できない。このため、ヒト蛋白質医薬品を長期に反復投与しても中和抗体が生産されることのない免疫寛容を示す動物の作製が切望されていた。

【0004】このような免疫寛容を示す動物の作製方法として、胎児期ないし新生期に抗原を反復投与して免疫寛容を惹起する方法、免疫抑制剤と共に投与する方法、離乳後の特定の時期に少量の抗原を繰返し投与して少量域寛容を惹起、または、比較的大量の抗原を繰返し投与して大量域寛容を誘導する方法等がある。しかし、抗原を繰返し投与する操作は非常に煩雑で、特に胎児や新生児への抗原の反復投与は技術的にも難しい。また、免疫抑制剤の投与は動物の持つ本来の免疫系を変化させる欠点がある。さらに、このような獲得寛容では誘導される免疫寛容の度合いが個体により様々で均一に制御することが難しかった。

【0005】また、近年技術確立がなされたトランスジェニック動物技術を活用して、抗原となるヒト蛋白質の遺伝子をあらかじめ動物に導入して体内で発現させることで、非自己蛋白質を自己蛋白質と認識させて免疫寛容を先天的に獲得させる方法が考案されている。しかし、免疫寛容を誘導するために、生体内で継続的に生産されるヒト蛋白質医薬品の不必要な作用が、該医薬品の本来の薬効や毒性の正確な評価の妨げとなる。これに対して、薬剤による誘導制御ができる遺伝子の発現制御系を活用した融合遺伝子の使用が考案されているが、誘導に使用する薬剤の影響が生じる。このようなことから、煩雑な作業を必要とせず、均一な免疫寛容を示し、発現誘導に用いる薬物の不必要な作用を受けない免疫寛容を先天的に示す動物の作製技術の開発が望まれている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上述の状況に鑑み所望する特定の蛋白質に対して免疫寛容を示す動物の作製方法について鋭意研究を行った。すなわち、トランスジェニック動物技術を活用して先天的に免疫寛容を示す動物を作製する方法を検討した。この場合に、導入した遺伝子の発現を生理的条件により誘導する

システムが有効であると考えた。しかし、免疫担当細胞が教育される度合いは時期および組織により異なることが知られていることから、生理的条件による誘導をいつ、どのような組織で、どのように行うことが有効であるかが重要であると考えた。ヒトやヤギでは出生直後の新生児では、雌雄いずれにおいても乳腺から初乳に類似した奇乳と呼ばれる分泌物を出すことが報告されている。この奇乳は生理的なもので、一過性ではあるが母乳の分泌と同様のホルモン作用によると考えられている。また、その組成が初乳に類似していることから、奇乳の分泌に際しては乳蛋白質遺伝子が発現することを予測された。そこで乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下で発現する融合遺伝子を作製し、該融合遺伝子を導入したトランスジェニックラットを作製して精査した。その結果、該トランスジェニックラットは、奇乳を分泌する新生児期に導入した融合遺伝子を乳腺で一過性に発現することを見出した(Iirabayashi M. et al., Mol. Reprod. Dev., 43, 145-149 (1996))。

【0007】そして、この導入した遺伝子の発現時期が免疫担当細胞の自己蛋白質に対する教育時期に一致することから、乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下で所望する蛋白質の遺伝子が発現させることは、抗原提示細胞等の免疫感作にかかわる免疫担当細胞の教育を効果的に行うことができる可能性が高いと考えた。

【0008】しかも、該遺伝子の発現は乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下にあるため、これらの動物が妊娠・出産の過程を経て泌乳しない限り、内因的に該蛋白質を生産することはない。即ち、これらの動物の雄あるいは妊娠・出産の過程を含まない雌を用いる通常の反復投与試験においては、該遺伝子の発現により生産される薬物の作用を受けることがなく、このような動物を試験に供することは望ましいと考えられた。そこで、乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下で所望する蛋白質の遺伝子が発現するように設計した融合遺伝子を導入することで、本発明を完成するに至った。

【0009】従って、本発明の課題は、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示す動物の作製方法及びそれにより得られた免疫寛容動物を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明は、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示す動物の作製方法に関する。又、該方法により得られた免疫寛容動物に関する。すなわち、本発明は、乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の制御下で、所望する特定の非自己蛋白質を発現する融合遺伝子を前核期受精卵に導入し、これを用いて該蛋白質に対する免疫寛容動物を作製する方法である。本発明における乳蛋白質遺伝子の発現制御領域としてはウシ α S1カゼイン遺伝子の発現制御領域を例示することができる。また、所望する特定の非自己蛋白質の遺伝子

としては、ヒト成長ホルモンを挙げることができる。また、本発明は、このような方法により得られた免疫寛容動物に関する。

【0011】さらに本発明は、乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の制御下で、所望する特定の非自己蛋白質を発現する融合遺伝子を導入することよりなる、動物を特定蛋白質に対して免疫寛容にする方法に関する。本発明方法により作製される動物は、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示すため、該蛋白質を投与しても免疫応答せず、該蛋白質に対する中和抗体を産生しない。よって、薬物を反復して投与しても、投与した薬物の薬理効果や毒性を正確に評価することができる動物として、極めて有用である。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明により得られる免疫寛容動物は、導入した遺伝子が乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下で発現するように設計されているため、導入した遺伝子の発現が雌の泌乳期に限られることから、通常の医薬品の薬効や毒性を調べる試験では該遺伝子が発現することがない。従って、このような動物では、該遺伝子は発現されず、実施すべき試験に対して何ら影響しないため非常に有利である。さらに、乳腺での発現が非常に低いレベルでも有効であったことから、一般に個体に導入した場合に高発現させることが難しいcDNAの場合でも特別の強力な発現ベクターを使用することなく実施できる。また、該遺伝子の導入部位で低発現の場合でも免疫寛容が成立することから、その影響を受ける危険がなく有利であると考えられる。

【0013】本発明で用いる乳蛋白質遺伝子の発現制御領域としては、ヒト、ウシ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウス等の哺乳動物の各種カゼイン遺伝子や、 β ラクトグロブリン、 α ラクトアルブミン、ホエー酸性蛋白質(WAP)などの乳清蛋白質遺伝子の発現制御領域を用いることができる。この乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下に、目的とする蛋白質、即ち免疫寛容としたい蛋白質の遺伝子を導入した融合遺伝子を作製する。この時、目的とする蛋白質の遺伝子については、目的である免疫寛容にしたい蛋白質の遺伝子を用いればよく、特に限定されるものではない。このように作製された融合遺伝子を、マイクロインジェクション等の常法により前核期受精卵に注入を行う。融合遺伝子を注入した受精卵を、常法によりレシビエント(代理母)に移植し、産子を得る。次いで、得られた産子に目的とする遺伝子が導入されているかを検定する。例えば、組織の一部を用いて、目的とする蛋白質遺伝子に対する適当なプライマーを用いてPCR法により検定する方法等があげられる。目的遺伝子の導入が確認された動物個体を繁殖することにより、安定した目的蛋白質に対する免疫寛容動物を樹立することができる。本発明の免疫寛容を示す動物の作製方法は、哺乳動物全般、例えばマウス、ラッ

ト、モルモット、ウサギ、イヌ、サル等に広く応用することができる。

【0014】

【実施例】以下の実施例をもって本発明を詳細に説明するが、これらは単に例示するのみであり、本発明はこれらによって何ら限定されるものではない。

【0015】

【実施例1】乳蛋白質遺伝子の発現制御領域の支配下でヒト成長ホルモン遺伝子を発現するラットの作製方法

(1) 注入遺伝子の調製方法

ウシ α S1カゼイン遺伝子の発現制御領域の支配下でヒト成長ホルモン遺伝子が発現するように設計した注入用の融合遺伝子 ($\beta\alpha$ SIQN/hGH: 図1) は、二宮らの方法 (T. Ninomiya et al., Mol. Reprod. Dev. 37, 276-283 (1994)) に従って調製した。この注入遺伝子は、ウシ α S1カゼイン遺伝子の発現制御領域約0.7kbと、構造遺伝子、イントロン及びポリA領域を含むヒト成長ホルモン遺伝子約2.1kbより構成される。注入遺伝子は GENE CLEAN II (BIO 101 INC. 社製) を用いて精製し、注入遺伝子が $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように注入用バッファー (0.1mM EDTAを含む10mM Tris-HCl, pH7.5) で調製した。尚、調製した注入遺伝子溶液は、注入操作するまでは -20°C で保存した。

【0016】(2) トランスジェニックラットの作製方法

上記(1)で調製した注入用DNA溶液のラット前核期受精卵へのマイクロインジェクションは、常法に従い下記の手順で行った。即ち、性成熟した8週齢のウイスター (Wistar) ラットを明暗サイクル12時間 (4:00~16:00を明時間)、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度55~5%で飼育した。膣スミア法により雌の性周期を観察して、ホルモン処理日を選択した。まず、雌ラットに150IU/kgの妊馬血清性腺刺激ホルモン (日本ゼンヤク社製: PMS全葉 (pregnant mare serum gonadotropin; PMSG)) を腹腔内投与して過剰排卵を誘発し、その48時間後に75IU/kgのヒト絨毛性腺刺激ホルモン (三共臓器社製: プベローゲン (human chorionic gonadotropin; hCG)) を投与後、雄との同居により交配を行った。hCG投与32時間後に卵管灌流により前核期受精卵を採取した。卵管灌流および卵の培養にはmKRB液 (Tovoda Y. and Chang M.C., J. Reprod. Fertil., 36, 9-22 (1974)) を使用した。採取した受精卵を0.1%ヒアルロニダーゼ (シグマ社製: Hvaluronidase Type I S) を含むmKRB液中で 37°C 、5分間の酵素処理を行い卵丘細胞を除去した後、mKRB液で3回洗浄して酵素を除去し、DNA注入操作まで炭酸ガス培養器内 ($5\%\text{CO}_2$, 95%Air, 37°C , 飽和湿度) に保存した。

【0017】この様にして準備したラット受精卵の雄性前核にDNA溶液を注入した。注入操作した277個卵を

12匹のレシビエントに移植して9匹の産仔を得た。注入したDNAのラットへの導入は、離乳直後に断尾して得た尾より調製したDNAをPCR法により検定を行った。即ち、プライマーセットBAC003 (配列表配列番号1) 及びBAC102 (配列表配列番号2) を使用した。PCR反応 (パーキン・エルマ社製 480型DNAサーマルサイクラーを使用して酵素反応 (DNA $2\mu\text{g}/\text{mL}$, Taq DNA polymerase 16U/mL, プライマー各 200 nM, 10mM Tris-HCl buffer, 50mM KCl, 2.5mM MgCl₂, 0.02% ゼラチン, dNTP 0.2 mM) で 95°C (0.5分間) - 55°C (1分間) - 72°C (1分間) を30サイクル) 後、電気泳動 (Advance 社製 MupidIT) を使用して4%アガロースゲル, 40mM Tris-acetate/1mM EDTA, pH8) した。増幅したDNA断片は、エチジウムブロマイド染色により検出した。その結果、8匹のトランスジェニックラットを得た。得られたラットを常法により繁殖し、導入遺伝子が発現して乳中で生産するヒト成長ホルモン量が異なる3ラインのトランスジェニックラットを樹立した。尚、乳中のヒト成長ホルモン量はヒト成長ホルモン ELISAキット (ペーリンガー・マンハイム社製: 製品番号 1585 878) を使用して測定した。

【0018】(3) トランスジェニックラットの特性

上記(2)で作製した3ラインのトランスジェニックの泌乳期の乳中に生産されるヒト成長ホルモン量、及び泌乳期と非泌乳期時の血清中のヒト成長ホルモン量を測定した。結果を表1に示す。この結果、ラインhGH-Hは乳中に約3mq/mlのヒト成長ホルモンを生産する高生産ラインで、その血清中のヒト成長ホルモン量は泌乳時には約2400ng/mLであるが、非泌乳期時は雌で0.75ng/mL、雄で0.29ng/mLで、内因性の生理的濃度の雌の93ng/mL、雄の75ng/mL (A. Ikeda et al., Endocrine J., 41, 523-529 (1994)) のそれぞれ 1/120および1/260であった。このトランスジェニックラットは巨大化や生殖異常を示さないことから、導入した遺伝子の影響はないものと判断された。ラインhGH-Lは乳中に約0.3mq/mLのヒト成長ホルモンを生産する低発現ラインで、その血清中のヒト成長ホルモン量は、泌乳時に約700ng/mLであるが、非泌乳期時には、雌雄共に検出限界 (50pg/mL) 以下であった。

一方、ラインhGH-Fは乳中に約0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のヒト成長ホルモンを生産する微発現ラインで、その血清中のヒト成長ホルモン量は、泌乳時、非泌乳時のいずれにおいても、また雄においても、全て検出限界以下であった。ラインhGH-L、hGH-Fはいずれも巨大化や生殖異常を示さず、これらラインにおいても導入した遺伝子の影響はないものと判断された。

【0019】

【表1】

| ライン名 | 性 | ヒト成長ホルモン量 | | |
|-------|----|------------------------|-----------------------|--------|
| | | 乳 ($\mu\text{g/ml}$) | 血清 (ng/ml) | |
| | | | 泌乳前 | 泌乳時 |
| bGH-H | 雌雄 | 3,400 | 0.75 0.29 | 2,400 |
| bGH-L | 雌雄 | 280 | 測定限界以下 測定限界以下 | 700 |
| bGH-P | 雌雄 | 0.01 | 測定限界以下 測定限界以下 | 測定限界以下 |

(*測定限界: 50 pg/ml 血清又は乳 (1 pg/ml))

【0020】

【実施例2】免疫寛容試験

実施例1で得られたトランスジェニックラットを繁殖させた。尚、哺育にあたっては経口的な免疫応答の影響を排除する目的で野性種の乳母を使用した。8週齢の各ラインの雄と野性種のWistarラットの雄を試験に供した。トランスジェニックラットは一群2~4匹、野性種は一群5~8匹を使用した。抗原のヒト成長ホルモンは遺伝子組換えヒト成長ホルモン製剤（ヒューマトロップ；日本イーライリリー社製）を使用した。なお、抗原感作前の各ラット血清中のヒト成長ホルモン量は、bGH-H(高発現ライン)で8匹の平均値が0.29ng/ml (0.13~0.59 ng/ml)であった以外はすべて検出限界(50pg/ml)以下であった。

【0021】抗原のラットへの投与は下記の要領で行った。即ち、PBS液で50 μg /250 μl に調製したヒト成長ホルモン溶液に等量のプロイントの完全アジュバンド(DIFCO社製)を加え、常法に従いエマルジョンを作製した。得られたエマルジョン液500 μl をラットの皮下に数カ所に分けて投与した。一方、抗原非投与群では、PBS液と等量のプロイントの完全アジュバンドで同様にエマルジョンを作製して皮下に500 μl ずつ投与した。1週間間隔で第2回目および第3回目の投与をプロイントの不完全アジュバンドを使用して第1回目と同じ要領で投与した。最終免疫の1週間後の第4週目に血液を採取して産生された抗ヒト成長ホルモン抗体の量を下記の要領で測定した。コーティング液(0.02% Na₂S₂O₃を含む50mM Sodium carbonate pH9.6)で1 $\mu\text{g/ml}$ に調製し

たヒト成長ホルモン溶液を96穴ELISAプレート(Nunc社製)の各穴に100 μl ずつ加え、室温で2時間静置して抗原をプレートに吸着させた。抗原溶液を除去した後、各穴を洗浄液(0.5% Tween 20と0.02% Na₂S₂O₃を含むPBS)で3回洗浄した。

【0022】次に、200 μl のブロッキング溶液(PBSで4倍希釈したブロックエース(大日本製薬社製；カタログ番号UK-B25))を加え室温で2時間静置した後、ブロッキング液を除去し、洗浄液で3回洗浄して抗原をコートしたELISAプレートを作製した。得られたELISAプレートの各穴に、PBSで10倍、100倍、1,000倍に希釈した血液サンプルを100 μl ずつ加え、室温で2時間静置して抗原抗体反応を行わせた後、血液サンプルを除去し、洗浄液で3回洗浄した。次にPBSで2000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識した抗ラット抗体(1 μM +1 μg)ヤギ1 μg 溶液(コスモバイオ社製；カタログ番号SBA-3010-04)を100 μl ずつ加え、2時間反応後、洗浄液で5回洗浄した。アルカリフォスファターゼ基質溶液(Sigma 104 phosphatase substrateを2mMになるように基質溶解液(0.5mM MgCl₂, 0.02% Na₂S₂O₃を含む1M diethanolamine, pH9.8)で溶解)100 μl を加えて、室温で20~90分間反応をさせて黄色の発色を行い、50 μl の反応停止液(3M NaOH)を加えて反応を停止した。イムノリーダー(バイオ・ラッド社製 Model 3550-UV)を用いて405nmの吸光度を測定した。抗体の産生量を吸光度で評価した。結果を表2に示す。

【0023】

【表2】

| ライン名 | 感作 | 個体番号 | 抗原抗体反応 (希釈倍数) | | |
|-----------------|--------------|------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | | (10 ¹) | (10 ²) | (10 ³) |
| 対照群 (Wistar) | 感作 (hGH) | 1 | +++ | +++ | ++ |
| | | 2 | +++ | +++ | ± |
| | | 3 | +++ | +++ | ++ |
| | | 4 | +++ | + | ± |
| | | 5 | +++ | +++ | + |
| | | 6 | +++ | +++ | ± |
| | | 7 | +++ | +++ | ± |
| | | 8 | +++ | +++ | + |
| | 非感作 (PBS) | 6 | ± | - | - |
| | | 7 | - | - | - |
| hGH-H | 感作 (hGH) | 11 | - | - | - |
| | | 12 | - | - | - |
| | | 13 | - | - | - |
| | | 14 | - | - | - |
| | 非感作 (PBS) | 15 | - | - | - |
| | | 16 | - | - | - |
| | | 17 | ± | - | - |
| | | 18 | - | - | - |
| hGH-L | 感作 (hGH) | 19 | - | - | - |
| | | 20 | - | - | - |
| | 非感作 (PBS) | 21 | - | - | - |
| | | 22 | - | - | - |
| hGH-P | 感作 (hGH) | 23 | - | - | - |
| | | 24 | ± | - | - |
| | | 25 | - | - | - |
| | | 26 | - | - | - |
| | 非感作 (PBS) | 27 | - | - | - |
| | | 28 | - | - | - |
| | | 29 | - | - | - |
| | | 30 | - | - | - |

(* ELISA法による抗原抗体反応の判定は、各サンプル個体より得た血液の希釈倍体の吸光度 (E) を測定し、ブランク値 (E₀) から測定値 (E) がどの程度増加 (E-E₀) したかを示した。そして、E-E₀>2E₀ を +++、2E₀≥E-E₀>E₀ を ++、E₀≥E-E₀>0.5E₀ を +、0.5E₀≥E-E₀>0.1E₀ を ±、0.1E₀≥E-E₀ を - で表した。尚、E₀ は酵素標識抗体無添加時のブランク値の平均値 (00値は (0.16) であった) を示す。)

【0024】この結果、対照群のWistarラットの感作群では、10倍希釈のすべてと100倍希釈の8個体中の6個体の血液サンプルで非常に強い抗原抗体反応(+++)を認めた。また、100倍希釈の8個体中の1個体(No.3)と1000倍希釈の8個体の2個体(No1とNo3)の血液サンプルで強い抗原抗体反応(++). また、100倍希釈の8個体中1個体(No4)と1000倍希釈の8個体中3個体(No5, No6, No8)の血液サンプルで明らかな抗原抗体反応(+)を認めた。また、非感作用群では全例に全希釈血液サンプルで抗原抗体反応を認めなかった。一方、トランスジェニックラットでは感作群と非感作群にいずれにおいても抗原抗体反応を認めることはできなかった。この結果より、すべてのトランスジェニックラットにおいてヒト成長ホルモンに対する免疫寛容が成立していることを確認した。そして導入した該遺伝子により乳中で生産されるヒト成長ホルモンが非常に低いライン(hGH-L)においても、高い生産ライン(hGH-H)や低いライン(hGH-L)と同様に免疫寛容が成立していることから、本発明により提*

* 供される免疫寛容動物の作製方法が非常に優れた方法であることが確認された。特に、ライン hGH-Fは、雄および雌の泌乳・非泌乳にかかわらず、血清中にヒト成長ホルモンを認めないことから、最もすぐれたラインであると判断された。

【0025】

【発明の効果】本発明により、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示す動物の作製方法、及び該方法により得られた免疫寛容動物が提供される。本発明方法により作製される動物は、所望する特定の非自己蛋白質に対して免疫寛容を示すため、該蛋白質を投与しても免疫応答せず、該蛋白質に対する中和抗体を産生しない。よって、薬物を反復して投与しても、投与した薬物の薬理効果や毒性を正確に評価することができる動物として、極めて有用である。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> YS NEW TECHNOLOGY INST. INC.
- <120> Animal with immunological tolerance
- <130> SNMF P00411
- <160> 2

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 1

aqaacaatgc catttcattt cctgt

25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthesized DNA

<400> 2

qtqqttttcaq ttraaccaac caqgt

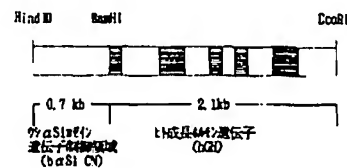
25

【図面の簡単な説明】

* 部はエクソン部位を示す。

【図1】 注人遺伝子(hαS1CN/hGH) の構造を示す。斜線*

【図1】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA03 CA04 DA02 EA04
 GA12 HA01 HA20
 4B065 AA91X AA99Y AB01 BA04
 CA24 CA46